

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Februar 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/11771 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 49/22**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08377

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Juli 2001 (20.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 37 832.3 3. August 2000 (03.08.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH** [DE/DE]; Weberstrasse 5, 76133 Karlsruhe (DE). **UNIVERSITÄT HEIDELBERG** [DE/DE]; Grabengasse 1, 69117 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **DINJUS, Eckard** [DE/DE]; Am Fischmal 9, 76774 Leimersheim (DE).

BAUM, Marina [DE/DE]; Im Bürgergarten 21, 07747 Jena (DE). **BEHRENS, Silke** [DE/DE]; Kaiserstrasse 48, 76131 Karlsruhe (DE). **UNGER, Eberhard** [DE/DE]; Rosenweg 19, 07751 Jena-Cospeda (DE). **KÜCHERER, Helmut** [DE/DE]; Silcherstrasse 11, 68789 St. Leon-Roth (DE). **BEKEREDJIAN, Raffi** [DE/DE]; Hans-Thoma-Platz 24, 69121 Heidelberg (DE). **RUEF, Johannes** [DE/DE]; Neckarsteinacherstrasse 59A, 69151 Neckargmünd (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CONTRAST MEDIUM FOR MEDICAL DIAGNOSTICS

(54) Bezeichnung: KONTRASTMITTEL FÜR MEDIZINISCHE DIAGNOSTIK

(57) Abstract: The aim of the invention is to provide a novel contrast medium for medical diagnostics. To this end, the invention provides a contrast medium consisting of geometrically highly regular proteins which are filled with metal clusters.

(57) Zusammenfassung: Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein weiteres Kontrastmittel für die medizinische Diagnostik vorzuschlagen. Die Aufgabe wird gelöst durch ein Kontrastmittel bestehend aus geometrisch hochgeordneten Proteinen, die mit Metallclustern besetzt sind.



WO 02/11771 A2

Kontrastmittel für medizinische Diagnostik

Die Erfindung betrifft ein Kontrastmittel für medizinische Diagnostik gemäß dem ersten Patentanspruch und seine Verwendung gemäß den Ansprüchen 7 und 8.

Kontrastmittel werden in der Medizin zur Optimierung bildgebender diagnostischer Verfahren eingesetzt.

In der Echokardiographie wird zwischen Rechtsherz- und Linksherz-Kontrastmitteln unterschieden. Rechtsherz-Kontrastmittel passieren aufgrund ihrer Partikelgröße und Instabilität die Lungenkapillaren nicht und sind somit lediglich zur Erkennung von sogenannten Shunts zwischen rechter und linker Herzhälfte und zur Verstärkung von Trikuspidal- und Pulmonalflußgeschwindigkeiten geeignet. Linksherz-Kontrastmittel sind klein und stabil genug, um nach intravenöser Gabe die Lungenkapillaren zu passieren. Bislang untersuchte Anwendungsbereiche sind die Verstärkung von Dopplersignalen (z. B. Pulmonalvenenfluß), die Endokardkonturabgrenzung, z. B. bei der Streßechokardiographie, und die Beurteilung der Myokardperfusion.

Die ersten Ultraschallkontrastmittel mit diesen Eigenschaften bestanden aus luftgefüllten Mikrosphären mit mittleren Durchmessern von ca. 2 bis 5 μm , die von Albumin oder Galactose-Palmitinsäurehüllen umgeben waren. Solche Kontrastmittel werden beispielsweise von Hayat Alkan-Onyuksel et al, Journal of Pharmaceutical Sciences Vol. 85, No. 5 /1996) 486-490 beschrieben.

Die Herstellung der Mikrosphären erfolgt durch hochfrequente Ultraschallanregung von Humanalbumin oder durch die Lösung von Galactose in Wasser. Diese Kontrastmittel haben ähnliche rheologische Eigenschaften wie rote Blutkörperchen und wirken sich daher nicht auf die systemische oder koronare Hämodynamik aus. Die Signalverstärkungsdauer der von Albuminhüllen umgebenen Mikrosphären beträgt jedoch nur wenige Sekunden, bedingt durch die druck-

abhängige Zerstörung der luftgefüllten Mikrosphären und der Löslichkeit von Luft im Blut. Für länger anhaltende Anfärbungen des linken Ventrikels sind Kontrastmittel mit größerer Stabilität notwendig.

Eine größere Stabilität der Kontrastmittel wird erzielt, wenn die Luft in den Mikrosphären durch ein inertes Gas ersetzt wird (D. M. Skyba et al, Journal of the American College of Cardiology, Vol 28 No. 5 (1996) 1292-1300). Inerte Gase sind in Blut weitaus weniger löslich als Luft. Hierdurch kann die Signalverstärkungsdauer auf bis zu 4 Minuten verlängert werden.

Die Effektivität der Kontrastverstärkung hängt von den physikalischen Eigenschaften der Mikrobläschen, dem erzeugten akustischen Feld und den Signalverarbeitungsverfahren ab. Neuere Verfahren in der Echokardiographie (das sogenannte „Harmonic Imaging“) nutzen die Kompressibilität des Kontrastmittels aus, um die reflektierten harmonischen Oberschwingungen zu registrieren und somit eine Verstärkung der Kontrastwirkung zu erzielen. Ein „Harmonic Imaging“ ist jedoch bei den üblicherweise verwendeten Ultraschallgeräten nicht möglich.

Echosignalintensitäten im Ultraschallbild werden durch das akustische Rückstreuverhalten der Struktur im Schallfeld bestimmt. So entstehen Streu- und Binnenechos an anatomischen Strukturen, die kleiner sind als die Wellenlänge des einfallenden Ultraschalls. Die Rückstreuintensität ist dabei proportional zur sechsten Potenz des Mikrosphären-Radius.

Es ist bereits vorgeschlagen worden, die beschriebenen Echokontrastmittel mit Antikörpern zu koppeln, um Thromben besser darzustellen (Lanza et al, Circulation Vol. 94, No. 12 (1996) 3334-3339). Hierzu wurde ein eigens dazu entwickeltes Kontrastmittel (Perfluorcarbon-Phosphatidylethanolamin- Mikroemulsion) zunächst biotinyliert und über eine Biotin-Avidin-Bindung unter Verwendung von anti-Fibrinogen-Antikörpern spezifisch an die Oberfläche des Thrombus gebunden.

Die Kopplung von Antikörpern über eine direkte kovalente Bindung an das Kontrastmittel wird von S. M. Demos et al, Journal of the American College of Cardiology Vol. 33, No. 3 (1999) 867-875 beschrieben.

Von geringerem Nutzen sind die bekannten, an Antikörper gekoppelten Kontrastmittel vor allem wegen ihrer geringen Stabilität und damit ihrer geringen Lebensdauer in vivo. Die Kontrastwirkung ist deshalb nach einer Injektion des Kontrastmittels zeitlich eng begrenzt.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, die beschriebenen Nachteile zu vermeiden und insbesondere ein Kontrastmittel für medizinische Zwecke vorzuschlagen, das in vivo eine wesentlich höhere Stabilität aufweist.

Die Aufgabe wird durch das im ersten Patentanspruch beschriebene Kontrastmittel gelöst. Die Ansprüche 7 und 8 geben die Verwendung des Kontrastmittels an.

Erfindungsgemäß wird ein Kontrastmittel vorgeschlagen, das aus geometrisch hochgeordneten Proteinen besteht und mit Metallclustern besetzt ist. Unter geometrisch hochgeordneten Proteinen werden dabei Proteine verstanden, die im Prozeß der Selbstassemblierung hochgeordnete zwei- oder dreidimensionale Strukturen ausbilden. Solche Proteine sind beispielsweise bakterielle Zellhüllproteine, Kollagen, Actinfilamente oder Mikrotubuli, wobei die letztgenannten bevorzugt werden. Diese Proteine sind mit Metallclustern besetzt. Die Metallcluster können aus einem körperverträglichen Metall, insbesondere einem Edelmetall, beispielsweise aus Gold, aber auch aus Silber, Palladium, Platin oder Titan und deren Legierungen bestehen. Die Größe der Metallcluster soll im Bereich von 2 nm bis 100 nm liegen, wobei Clustergrößen von 5 nm bis 20 nm besonders bevorzugt werden. Die Clusterdichte wird vorzugsweise so hoch wie technisch erreichbar gewählt.

Derartige mit Metallclustern besetzte hochgeordneten Proteine

werden in einem völlig anderen technischen Zusammenhang in der WO 97/448837 und in der Veröffentlichung von R. Kirsch et al.: „Three-dimensional metallization of microtubules“, Thin Solid Films 305 (1997) 248-253 beschrieben. In der erstgenannten Druckschrift bilden die mit Metallclustern besetzten Proteine eine Zwischenstufe bei der Herstellung von mikromechanischen und mikroelektromechanischen Bauteilen. In beiden Druckschriften wird die Herstellung der clusterbesetzten Proteine und deren Struktur eingehend beschrieben.

Es hat sich gezeigt, daß mit diesen hochgeordneten, mit Metallclustern besetzten Proteinen ein wirksames Kontrastmittel für die medizinische Diagnostik, insbesondere für die Echokardiographie und die Computertomographie, geschaffen wird.

Das erfindungsgemäße Kontrastmittel kann venös, arteriell oder über einen Katheter appliziert werden.

Gegenüber den bekannten Kontrastmitteln ergeben sich die folgenden Vorteile.

In Vorversuchen wurde bereits eine erheblich größere Stabilität dieser Kontrastmittel in einem Ultraschallfeld nachgewiesen, so daß die mit der geringen Stabilität bekannter Kontrastmittel verbundenen Nachteile vermieden werden können. Der Kontrasteffekt beruht erfindungsgemäß nicht auf eingeschlossenen Gasblasen, sondern auf fest auf den Proteinen haftenden Metallclustern.

Die clusterbesetzten hochgeordneten Proteine lassen sich zudem in an sich bekannter Weise mit Antikörpern koppeln. Dies kann entweder über bispezifische Antikörper oder über eine direkte kovalente Bindung über funktionelle Gruppen erfolgen. Als bispezifische Antikörper können solche Antikörper eingesetzt werden, welche auf einer Seite eine anti-Tubulin-Komponente besitzen und auf der anderen Seite gegen das zu untersuchende Epitop gerichtet sind. Alternativ können sogenannte „Linker“ eingesetzt wer-

den, die mittels kovalenter Bindungen das clusterbesetzte Protein und den Antikörper verbinden. Die erheblich höhere Stabilität der clusterbesetzten Proteine macht solche Kontrastmittel erst attraktiv. Als Antikörper kommen praktisch alle an sich bekannten, monoklonalen oder polyklonalen Antikörper in Betracht. Mögliche Epitope sind Fibrinogen oder Gp IIb/IIIa z. B. für Thromben-Untersuchungen, Kollagen, der Willebrand Faktor-Rezeptor, VCAM-1 oder ICAM-1 z. B. für Endothel-Untersuchungen; die jeweiligen Antikörper entsprechen den Epitopen: Anti-Fibrinogen-Antikörper, Anti-Gp IIb/IIIa-Antikörper etc.

Da die clusterbesetzten Proteine im Vergleich zu gasgefüllten Mikrosphären eine sehr geringe Kompressibilität aufweisen, sind die aufwendigen Maßnahmen im Rahmen des „Harmonic Imaging“ zur Erkennung der harmonischen Oberschwingungen des Kontrastmittels nicht notwendig.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen und Figuren näher erläutert.

Es zeigen

Fig. 1 mit 10 nm großen Gold-Clustern besetzte Mikrotubuli;

Fig. 2 Palladium-Cluster auf einem Mikrotubulus;

Fig. 3 fluoreszierende mit Gold-Clustern besetzte Mikrotubuli;

Fig. 4 sonographische Beispiele für in-vitro-Untersuchungen zur Echogenität clusterbesetzter Mikrotubuli.

Beispiel 1

Darstellung von Mikrotubuli mit Gold- und Palladium-Clustern

a) Assemblierung und Fixierung von Mikrotubuli

Die Assemblierung von Mikrotubuli aus einer Proteinlösung mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml Tubulin erfolgte in einer Pufferlösung I von 20 mM Piperazindiethansulfonsäure (PIPES) mit pK_a 6,8 und 80 mM NaCl, 0,5 mM $MgCl_2$ sowie 1 mM Ethylenglykol-bis-(2-Aminoethyl)-Tetraessigsäure (EGTA) durch Zugabe von 10 mM Guanosintriphosphat (GTP) und 10 μ M Taxol bei

einer Temperatur von 37°C in 20 Minuten. Die Mikrotubuli wurden zunächst in 0,05 %, dann nach 1 h in 1 % Glutaraldehyd unter starkem Rühren fixiert. Die Reduktion der freien Aldehydgruppen erfolgte mit einer wäßrigen NaBH₄-Lösung (50 mg NaBH₄ in 1 ml Wasser). Nach ca. 30 min wurde die Reaktionslösung gegen 2000 ml Wasser/Puffer I im Verhältnis von 10:1 über Nacht dialysiert.

- b) Herstellung von mit Gold-Clustern besetzten Mikrotubuli
- 100 ml einer kolloidalen Goldsuspension (Polyscience: Au-Partikeldurchmesser 10 nm, Au-Konzentration 44 µg/ml) wurden in der Zentrifuge auf ca. 10 ml aufkonzentriert, mit 20 ml der nach Beispiel 1a assemblierten und fixierten Mikrotubuli versetzt und innerhalb von 30 min bei Raumtemperatur auf den Mikrotubuli immobilisiert. Das Reaktionsgemisch wurde im Dialyseschlauch gegen Polyethylenglykol (20000) auf ca. 4 ml aufkonzentriert. Nach dem Aufkonzentrieren betrug die Goldkonzentration ca. 1,1 mg/ml und die Proteinkonzentration ca. 5 mg/ml. Die mittlere Clustergröße ergab sich zu 10 nm.

In Fig. 1 ist eine Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme mit 140000-facher Vergrößerung dieser aufkonzentrierten Lösung dargestellt. Die Mikrotubuli sind als vernetzte, vor dem helleren Hintergrund dunkel erscheinende Fäden und die Goldcluster als schwarze Punkte abgebildet.

- c) Darstellung von mit Palladium-Clustern besetzten Mikrotubuli
- 20 ml der nach Beispiel 1a assemblierten und fixierten Mikrotubuli mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml wurden mit 80 ml einer wäßrigen Na₂PdCl₄-Lösung (0,0125 M) versetzt und bei 90°C in 1 h mit 8 ml einer wäßrigen Lösung des Trinatriumsalzes der Zitronensäure (0,25 M) reduziert. Die Probe wurde im Dialyseschlauch auf ca. 4 ml gegen Polyethylen (20000) aufkonzentriert. Nach dem Aufkonzentrieren betrug die Pd-Konzentration ca. 26.6 mg/ml und die Protein-Konzentration ca. 5 mg/ml. Die Clustergröße lag bei ca. 2 nm.

In Fig. 2 ist eine Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme mit 20000-facher Vergrößerung dieser aufkonzentrierten Lösung dargestellt.

Beispiel 2

Kopplung von Antikörpern

Die Kopplung von Antikörpern an die mit Metallclustern besetzten Mikrotubuli wurde durch die Kopplung eines Primärantikörpers (Anti- β -Tubulin) an die Proteinstruktur und anschließende Kopplung eines fluoreszenz (Cy3)-markierten Sekundärantikörpers demonstriert.

Dazu wurden zunächst die verwendeten Objektträger 10 min mit einer wässrigen Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDDA)-Lösung (1 %) behandelt, 5 min unter laufendem Wasser von überschüssigem PDDA befreit und dann getrocknet. 75 μ l der nach Beispiel 1a und 1b hergestellten Proben wurden 30 min auf dem beschichteten Objektträger inkubiert und mehrmals mit je 75 μ l Waschlösung I (Phosphatpuffer: pH 7,2, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 , 1 % Bovinserumalbumin (BSA)) gewaschen. Danach wurde die Probe mit je 75 μ l Primärantikörper (Anti- β -Tubulin (50 μ g/ml), monoclonal antibody, antimouse IgG der Firma Böhringer Mannheim, 1:50 verdünnt mit Waschlösung I) 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit Waschlösung I wurde die Probe mit einem Cy3 markierten Sekundärantikörper (Antimouse IgG (1 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer, 1 % BSA, 15 mM NaN_3) der Fa. Sigma, 1 : 300 verdünnt mit Waschlösung I, Absorption (Cy3): 552 nm, Emission (Cy3): 565 nm) für 1 h in der Dunkelheit in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit Waschlösung I wurde dann 1 Tropfen Citifluor in Glycerol und PBS-Lösung auf den Objektträger gegeben. Zur Kontrolle wurde außerdem eine Probe ohne Zugabe von Primärantikörper hergestellt. Die Fluoreszenz-Untersuchungen der Probe erfolgten im Mikroskop (Fluoreszenz-Anregung: $\lambda = 540 - 560$ nm).

Die Untersuchung der Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) zeigte keine Fluoreszenz. Bei allen anderen Proben (reine Mikrotubuli und Mikrotubuli mit Au-Clustern) fluoreszierten die markierten Mikrotubuli. Somit ist die Kopplung von Antikörpern an die mit Metallclustern besetzten Mikrotubuli möglich.

Fig. 3 zeigt die fluoreszierenden, mit Au-Clustern beladenen Mikrotubuli.

Beispiel 3

Ultraschallversuche mit clusterbesetzten Mikrotubuli

Zur Durchführung von Ultraschallversuchen mit metallclusterbesetzten Mikrotubuli wurden in Testreihen Latex-Ballons mit verschiedenen Mikrotubuli-Suspensionen gefüllt und in einem Wasserbad durch eine 2,5 MHz Echokardiographiesonde im B-mode untersucht. Zum Vergleich wurde ein Kontrollballon mit reiner Pufferlösung (Puffer_ 20 mM Piperazindiethansulfonsäure (PIPES), pK_a 6,8, 80 mM NaCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 1 mM Ethylenglykol-bis-(2-Aminoethyl)-Tetraessigsäure (EGTA), 4 ml) sonographisch aufgezeichnet.

In einen mit 10 ml Puffer gefüllten Latexballon wurde eine Probe assemblierter und fixierter Mikrotubuli (Protein-Konzentration ca. 3 mg/ml) injiziert. Weiterhin wurde je ein Latexballon mit 1 ml Pufferlösung und 3 ml der nach Beispiel 1a und 1b hergestellten Proben gefüllt.

Während die reine Mikrotubuliprobe keinen eindeutigen und reproduzierbaren Kontrasteffekt im Ultraschall verursachte, zeigte sich bei den mit Goldclustern beladenen Mikrotubuli ein deutlicher Kontrasteffekt.

In Fig. 4 ist der Unterschied in der Echogenität zwischen reinen, metallfreien Mikrotubuli und goldbeladenen Mikrotubuli dargestellt. Es sind jeweils die Ultraschallbilder von Latexballons (4 ml Inhalt) in einem Wasserbad abgebildet. Links: Kontrolle

mit Puffer - keine Kontrastwirkung; rechts: mit Goldclustern beladene Mikrotubuli - Kontrastwirkung.

Die Suspension mit den goldbeladenen Mikrotubuli wurde mit Puffer verdünnt. Die verdünnten Suspensionen wurden nach der Ultraschalluntersuchung videodensitometrisch ausgewertet (Tabelle 1). Dabei zeigte sich erwartungsgemäß bei zunehmender Verdünnung eine Abnahme der Kontrastintensität.

Tabelle 1:

Videodensitometrische Untersuchung der sonographischen Aufnahmen von Verdünnungen der goldbeladenen Mikrotubulin-Suspension. Aufgeführt sind die Grauwerte der unverdünnten (4 ml) sowie der mit 5, 10 und 20 ml verdünnten Mikrotubuli-Suspensionen. Zum Vergleich sind die entsprechenden Daten einer Kontrolluntersuchung mit NaCl- und einer Levovist®-Lösung aufgeführt, sowie die unverdünnte goldbeladene Mikrotubuli-Suspension im „Harmonic Imaging“ Modus. (Levovist ist Linksherzkontrastmittel bestehend aus luftgefüllten Mikrosphären mit einer Hülle von Galaktose/Palmitinsäure und einem Durchmesser von ca. 2 µm. Die Viskosität wird mit 1,5 - 4 cP (25°C) und die Osmolalität mit ca. 950 (37°C) angegeben.)

Tabelle 1:

Substanz	Grauwertintensität (Mittelwert) \pm SD
Au-MT (unverdünnt)	141 \pm 35
Au-MT (mit 5 ml Puffer verdünnt)	133 \pm 49
Au-MT (mit 10 ml Puffer verdünnt)	84 \pm 64
Au-MT (mit 20 ml Puffer verdünnt)	42 \pm 55
Levovist®	180 \pm 35 (mit Harmonic Imaging)
NaCl	0,1 \pm 0,7

MT: Mikrotubuli

SD: Standard-Abweichung

Patentansprüche:

1. Kontrastmittel für medizinische Diagnostik bestehend aus geometrisch hochgeordneten Proteinen, die mit Metallclustern besetzt sind.
2. Kontrastmittel nach Anspruch 1, bei dem als Proteine Mikrotubuli eingesetzt werden.
3. Kontrastmittel nach Anspruch 1 oder 2, bei dem als Metall für die Cluster ein Edelmetall, Chrom, Nickel oder Titan eingesetzt wird.
4. Kontrastmittel nach Anspruch 3 mit Metallclustern aus Gold.
5. Kontrastmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4 bei dem die Metallcluster eine Größe von 2 bis 100 nm aufweisen.
6. Kontrastmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem die Proteine an Antikörper angekoppelt sind, die sich an Strukturen eines zu untersuchenden Epitops ankoppeln.
7. Verwendung des Kontrastmittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 für die Echokardiographie.
8. Verwendung des Kontrastmittels gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 für die Computertomographie.

1/3

Fig. 1

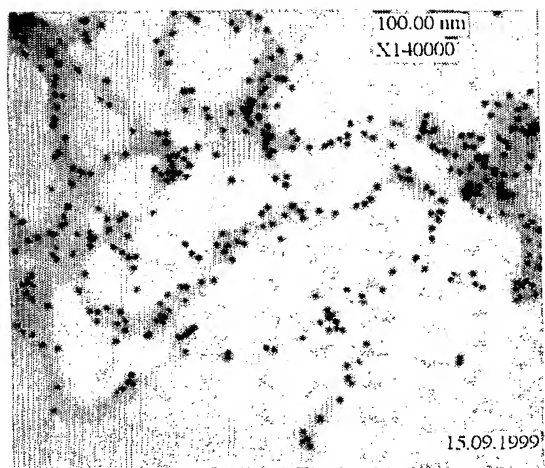
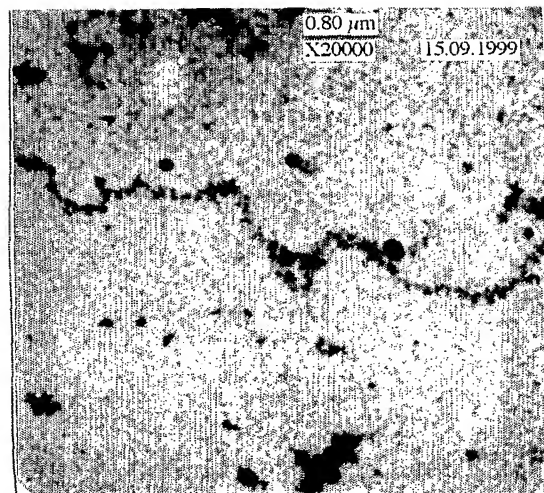


Fig. 2



2/3

Fig. 3

